

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06.01.2011**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.07.2012**
(Věstník č. 29/2012)

(21) Číslo dokumentu:

2011-9

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

A61L 2/02	(2006.01)
A61L 2/16	(2006.01)
G03F 7/004	(2006.01)
C07D 487/22	(2006.01)
C07D 265/12	(2006.01)
C07C 229/08	(2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Centrum organické chemie s.r.o., Rybitví, CZ
Univerzita Karlova v Praze, Praha 1, CZ

(72) Původce:

Rakušan Jan Ing. CSc., Přelouč, CZ
Karásková Marie Ing., Pardubice, CZ
Holada Karel Ing. Ph.D., Praha 3, CZ
Janoušková Olga Mgr. Ph.D., Horoušany - Horoušánky, CZ

(74) Zástupce:

PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Husova 5, České
Budějovice, 37001

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob inaktivace patogenních prionů,
fotosenzitizátor pro inaktivaci patogenních
prionů a použití fotosenzitizátoru pro
inaktivaci patogenních prionů**

(57) Anotace:

Způsob inaktivace patogenních prionů podle vynálezu zahrnuje ošetření substrátu alespoň jedním fotosenzitizátorem za současného působení světla a diatomického kyslíku. Ve výhodném provedení vynálezu fotosenzitizátor tvoří alespoň jedna látka ze skupiny derivátů fenothiazinu, porfyrinů, chlorinů, aminolevulové kyseliny, fenazinů, cyaninů, ftalocyaninů, naftalocyaninů. Reaktivní formy kyslíku vznikající interakcí fotosenzitizátoru se světlem jsou generovány bezprostředně na fotosenzitizátorem vybarveném prionu a mají možnost na něj účinně působit. Je výhodné, že fotosenzitizátor je tvořen látkou ze skupiny ftalocyaninů, přičemž základní strukturu fotosenzitizátoru tvoří sulfó skupiny nebo karboxy skupiny, nebo sulfamidické skupiny na ftalocyaninovém (porfyrinovém) skeletu, protože tyto skupiny zajišťují interakci s patogenními priony. Způsob a fotosenzitizátor podle vynálezu lze s výhodou použít pro inaktivaci patogenních prionů na organických nebo anorganických substrátech, v jakémkoli prostředí, a také ve formě dezinfekčního prostředku ve zdravotnických a jiných zařízeních.

Způsob inaktivace patogenních prionů, fotosenzitizátor pro inaktivaci patogenních prionů a použití fotosenzitizátoru pro inaktivaci patogenních prionů

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu inaktivace patogenních prionů, dále se týká látek, tzv. fotosenzitizátorů a dále použití těchto fotosenzitizátorů pro inaktivaci patogenních prionů.

Dosavadní stav techniky

Prion, označovaný jako infekční bílkovina, je název pro vadnou formu takzvané nepatogenní buněčné prionové bílkoviny, která se běžně vyskytuje v mnoha typech buněk savců, především v neuronech. Infekční, vadná forma prionové bílkoviny má, na rozdíl od nepatogenní prionové bílkoviny, odlišné prostorové uspořádání molekuly. Důsledkem této konformační změny je schopnost navazovat se na zdravou formu prionové bílkoviny a konvertovat ji na její vadnou, patogenní formu. Hromadění těchto prionů v nervové tkáni ve svém důsledku vede ke vzniku smrtelných neurogenerativních onemocnění savců, tzv. prionových chorob. Dalším důsledkem konformační změny nepatogenní prionové bílkoviny na její patogenní formu je mimořádná odolnost prionů vůči běžným desinfekčním prostředkům a různým fyzikálním vlivům, jako jsou vysoké teploty a tlak. Na základě dosud známých poznatků lze priony spolehlivě likvidovat pouze v alkalickém vodním prostředí za vysoké teploty a tlaku. Podmínky, při kterých jsou běžně prováděny sterilizace chirurgických nástrojů a zdravotního materiálu ke spolehlivé likvidaci patogenních prionů nestačí. Uvedené skutečnosti dokumentují závažný zdravotnický a současně i právní problém, spočívající v obtížně realizovatelné sterilizaci chirurgických nástrojů či jiného zdravotnického materiálu, které mohou být potenciálně kontaminovány patogenními priony a ty mohou být následně transportovány do jinak zdravého lidského organismu buď krevní cestou chirurgickými nástroji, či neinvazivní cestou např. přes sliznice jiným zdravotnickým materiálem apod. a být tak příčinou smrtelného onemocnění. Proto jsou nyní ve světě intenzivně hledány možnosti jak účinné prevence, tak terapie těchto chorob.

V současné době je využíván proces fotodynamické inaktivace mikroorganismů, nebo nádorových buněk. Účinek fotoinaktivace je závislý jednak na fotosenzitivní látce, dále na

světla vhodné vlnové délky a přítomnosti diatomického kyslíku. Je známa celá řada fotoaktivních substancí přírodních nebo syntetických, které způsobují fotoinaktivaci určitých mikroorganismů. Mezi tyto substance se řadí obvykle aromatické sloučeniny, často známé jako barviva – deriváty fenothiazinu, porfiriny, chloriny, aminolevulová kyselina, fenaziny, cyaniny, ftalocyaniny, naftalocyaniny. Tyto látky jsou používány k fotodynamické inaktivaci gram pozitivních a gram negativních bakterií jako hlavních cílových mikroorganismů. Jejich účinek je mimo jiné podmíněn i vhodnou molekulovou strukturou daného fotosenzitizátoru, která umožňuje jeho potřebnou fixaci na příslušnou bakterii.

Vhodnými fotosenzitizátory pro uvedenou fotodynamickou metodu mohou například být vodorozpustné ftalocyaninové deriváty, popisované v americkém patentu US 4,318,883. Tento dokument popisuje obecně způsob boje proti mikroorganismům v nebo na organických nebo anorganických substrátech a způsob ochrany těchto substrátů proti napadení mikroorganismy sloučeninami ftalocyaninů rozpustnými ve vodě, za přítomnosti kyslíku a vody a při současném ozařování viditelným a/nebo infračerveným světlem.

Úkolem vynálezu je vytvoření takového způsobu inaktivace patogenních prionů, který by odstraňoval nevýhody dosud známých postupů jejich likvidace v alkalickém prostředí za vysoké teploty a tlaku a umožňoval by likvidaci prionů v podstatě v neutrálním prostředí při běžné teplotě.

Podstata vynálezu

Tento úkol je vyřešen využitím způsobu inaktivace patogenních prionů, fotosenzitizátorem pro inaktivaci patogenních prionů a použitím fotosenzitizátoru pro inaktivaci patogenních prionů podle tohoto vynálezu.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že způsob inaktivace patogenních prionů zahrnuje ošetření substrátu alespoň jedním fotosenzitizátorem za současného působení světla a diatomického kyslíku. Fotosenzitizátor je funkcionální barvivo se schopností produkovat reaktivní formy kyslíku, zejména singletní kyslík, interakcí se světlem a diatomickým kyslíkem. Vysoce reaktivní formy kyslíku jsou generované při běžné teplotě a tlaku interakcí vhodného fotosenzitizátoru, diatomického kyslíku a světla. Řešení podle vynálezu lze tedy snadno

použít v jakémkoli prostředí, protože nedochází k žádným nežádoucím vedlejším účinkům. Tyto reaktivní formy kyslíku jsou schopny kvantitativně likvidovat patogenní priony i na zdravotnickém materiálu, přístrojích apod., takže je možné způsob podle vynálezu využít i ve formě dezinfekčního prostředku ve zdravotnických a jiných zařízeních.

Ve výhodném provedení vynálezu fotosenzitizátor tvoří alespoň jedna látka ze skupiny derivátů fenothiazinu, porfyrinů, chlorinů, aminolevulové kyseliny, fenazinů, cyaninů, ftalocyaninů, naftalocyaninů. Základní předpoklad pro fotodynamickou inaktivaci prionů je ten, že fotosenzitizátor musí být substantivní k patogennímu prionu a musí jej v podstatě vybarvovat. Reaktivní formy kyslíku vznikající interakcí ftalocyaninového fotosenzitizátoru se světlem jsou generovány bezprostředně na fotosenzitizátorem vybarveném prionu a mají možnost na něj účinně působit.

Je výhodné, že fotosenzitizátor je tvořen látkou ze skupiny ftalocyaninů, přičemž základní strukturu fotosenzitizátoru tvoří sulfo skupiny nebo karboxy skupiny, nebo sulfamidické skupiny na ftalocyaninovém (porfyrinovém) skeletu, protože tyto skupiny zajišťují interakci s patogenními priony. Fotosenzitizátor lze s výhodou použít pro inaktivaci patogenních prionů na organických nebo anorganických substrátech a pro ochranu těchto substrátů před napadením patogenními priony.

Dále je výhodné, že fotosenzitizátor obsahující sulfo skupiny či karboxy skupiny se aplikuje ve formě sodné, draselné, litné nebo amonné soli. Tyto soli jsou rozpustné ve vodě a zajistí dostatečnou substantivitu k patogenním prionům.

Je také výhodné, že fotosenzitizátor obsahující sulfamidické skupiny se aplikuje ve formě solí kyseliny chlorovodíkové, octové, ascorbové, mléčné, citronové nebo ve formě směsi těchto solí.

Předmětem vynálezu je také fotosenzitizátor pro inaktivaci patogenních prionů tvořený alespoň jednou látkou ze skupiny derivátů fenothiazinu, porfyrinů, chlorinů, aminolevulové kyseliny, fenazinů, cyaninů, ftalocyaninů, naftalocyaninů.

Ve výhodném provedení je fotosenzitizátor tvořený látkou ze skupiny ftalocyaninů, přičemž základní strukturu molekuly tvoří sulfo skupiny nebo sulfamidické skupiny na ftalocyaninovém (porfyrinovém) skeletu.

Dále je výhodné, když fotosenzitizátor obsahuje sulfo skupiny nebo karboxy skupiny a je ve formě sodné, draselné litné nebo amonné soli.

Také je výhodné, když fotosenzitizátor obsahuje sulfamidické skupiny a je ve formě solí kyseliny chlorovodíkové, octové, ascorbové, mléčné, citronové, nebo ve formě směsi těchto solí.

Dalším předmětem vynálezu je použití fotosenzitizátoru tvořeného alespoň jednou látkou ze skupiny derivátů fenothiazinu, porfyrinů, chlorinů, aminolevulové kyseliny, fenazinů, cyaninů, ftalocyaninů, naftalocyaninů pro inaktivaci patogenních prionů v nebo na organických nebo anorganických substrátech a pro ochranu těchto substrátů před napadením patogenními priony.

Výhodně lze použít fotosenzitizátor tvořený látkou ze skupiny ftalocyaninů, jehož základní strukturu molekuly tvoří sulfo skupiny nebo karboxy skupiny nebo sulfamidické skupiny na ftalocyaninovém (porfyrinovém) skeletu, pro inaktivaci patogenních prionů v/na organických nebo anorganických substrátech a pro ochranu těchto substrátů před napadením patogenními priony.

Také je výhodné použití fotosenzitizátoru obsahujícího sulfo skupiny nebo karboxy skupiny a aplikovaného ve formě sodné, draselné, litné nebo amonné soli pro inaktivaci patogenních prionů v nebo na organických nebo anorganických substrátech a pro ochranu těchto substrátů před napadením patogenními priony.

Nakonec je výhodné použití fotosenzitizátoru obsahujícího sulfamidické skupiny a aplikovaného ve formě solí kyseliny chlorovodíkové, octové, ascorbové, mléčné, citronové, nebo ve formě směsi těchto solí pro inaktivaci patogenních prionů v/na organických nebo

anorganických substrátech a pro ochranu těchto substrátů před napadením patogenními priony.

Výhodou řešení podle vynálezu je, že tento způsob s použitím fotosenzitizátorů podle vynálezu lze použít pro likvidaci patogenních prionů při běžné laboratorní teplotě, v neutrálním prostředí a nevyžaduje složitá technická zařízení pracující s vysoce alkalickým prostředím za současného použití vysoké teploty a tlaku. To je důležité zejména vzhledem ke skutečnosti, že všechny dosud ve světě známé prionové choroby jsou smrtelné a v současné době neléčitelné.

Příklady provedení vynálezu

Rozumí se, že dále popsané a zobrazené konkrétní příklady uskutečnění vynálezu jsou představovány pro ilustraci, nikoli jako omezení příkladů provedení vynálezu na uvedené případy. Odborníci znalí stavu techniky najdou nebo budou schopni zjistit za použití rutinního experimentování větší či menší počet ekvivalentů ke specifickým uskutečněním vynálezu, která jsou zde speciálně popsána. I tyto ekvivalenty budou zahrnuty v rozsahu následujících patentových nároků.

Vynález blíže objasňují následující příklady inaktivace patogeních prionů fotodynamickým způsobem, spočívajícím v synergickém působení vybraných ftalocyaninových fotosenzitizátorů a světla, v aerobním prostředí, na materiál prokazatelně infikovaný patogenními priony.

Příklad 1

K ověření fotodynamické inaktivace patogenních prionů byl jako zdroj prionů použit homogenát mozku myši v konečném stádiu prionové infekce po inokulaci laboratorním kmenem patogenních prionů „scrapie“ RML. Mozek myši obsahuje v tomto případě 10^8 - 10^9 infekčních dávek v 1 g tkáně. Homogenáty mozku v 1% a 0,1% koncentraci v isotonickém fosfátovém pufru o pH 7,4 byly upraveny přidávkou vodného roztoku ftalocyaninového fotosenzitizátoru, sodné soli disulfonovaného hydroxyhlinitého ftalocyaninu (HO)Al^{III}TC(SO₃Na)₂ tak, aby výsledné koncentrace této látky v uvedených homogenátech byly

5 μg /ml a 20 μg /ml. Fotosenzitizátorem upravené homogenáty byly následně inkubovány při pokojové teplotě po dobu 10, 30 a 60 minut. Inkubace probíhaly v definovaných podmínkách, v laminárním boxu, za osvitů zajišťovaném standardní zářivkou (1200 Lx) ze vzdálenosti (60 cm). Po skončení inkubaci byly homogenáty vždy přidány ke kultuře buněk katecholaminoergní neuronální linie (CAD 5), která se rutinně využívá pro testování infekitivity prionů. Buňky byly kultivovány po dobu 10 dnů a přítomnost prionů stanovena metodou buněčného blotu (Bosque JP, Prusiner SB: Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. J. Virol. 2000, 74, 4377-4386)

Experiment byl prováděn pro každou koncentraci homogenátu (1% a 0,1 %) a každou koncentraci fotosenzitizátoru (5 μg /ml a 20 μg /ml) vždy v duplikátech a třikrát opakován. Tímto způsobem bylo tedy pro každou sledovanou variantu provedeno šest identických experimentů. Ve všech těchto případech vedla inkubace mozkového homogenátu s 20 μg /ml (HO)Al FTC(SO₃Na)₂ již po 30 minutách osvitů ke kompletnímu vymizení infekce buněk patogenními priony. Výrazné snížení infekce bylo pozorováno také při použití nižší koncentrace fotosenzitizátoru (5 μg /ml), avšak v tomto případě nebyla eliminace kompletní.

Příklad 2

Stejný jako příklad 1, s tím rozdílem, že obdobného pozitivního výsledku bylo dosaženo, když místo sodné soli disulfonovaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého byla jako fotosenzitizátor použita směs sodných solí mono, di tri a tetra sulfonovaných hydroxyhlinitých ftalocyaninů (HO)Al FTC(SO₃Na)₁₋₄.

Příklad 3

Stejný jako příklad 1, s tím rozdílem, že obdobného, pozitivního výsledku bylo dosaženo, když místo sodné soli disulfonovaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého byly jako fotosenzitizátor použity směsi sodných, draselných či litných či amonných solí mono, di tri a tetra sulfonovaných hydroxyhlinitých ftalocyaninů (HO)Al FTC(SO₃Na)₁₋₄.

Příklad 4

Stejný jako příklad 1, s tím rozdílem, že obdobného, pozitivního výsledku bylo dosaženo, když místo sodné soli disulfonovaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého byla jako fotosenzitizátor použita sodná sůl disulfonovaného zinečnatého ftalocyaninu $\text{ZnFTC}(\text{SO}_3\text{Na})_2$.

Příklad 5

Stejný jako příklad 1, s tím rozdílem, že obdobného, pozitivního výsledku bylo dosaženo, když místo sodné soli disulfonovaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého byla použita jako fotosenzitizátor směs sodných solí mono, di tri a tetra sulfonovaných zinečnatých ftalocyaninů $\text{ZnFTC}(\text{SO}_3\text{Na})_{1-4}$.

Příklad 6

Stejný jako příklad 1, s tím rozdílem, že obdobného, pozitivního výsledku bylo dosaženo, když místo sodné soli disulfonovaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého byly jako fotosenzitizátor použity směsi sodných, draselných či litných či amonných solí mono, di tri a tetra sulfonovaných zinečnatých ftalocyaninů $\text{ZnFTC}(\text{SO}_3\text{Na})_{1-4}$.

Příklad 7

Stejný jako příklad 1, s tím rozdílem, že obdobných, pozitivních výsledků bylo dosaženo, když místo sodné soli disulfonovaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého byl jako fotosenzitizátor použit zinečnatý sulfamidický ftalocyanin $\text{ZnFTC}(\text{SO}_3\text{H})_{0-1}(\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2)_{1-3}$ ve formě vodorozpustné soli, hydrochloridu, sulfátu, acetátu, ascorbátu, citrátu či laktátu.

Průmyslová využitelnost

Řešení podle vynálezu lze použít pro fotodynamickou inaktivaci patogenních prionů pro léčebné účely, ale i při dezinfekci ve zdravotnických a jiných zařízeních, kde hrozí kontaminace patogenními priony.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob inaktivace patogenních prionů v nebo na organických nebo anorganických substrátech a pro ochranu těchto substrátů před napadením patogenními priony, **vyznačující se tím**, že zahrnuje ošetření substrátu alespoň jedním fotosenzitizátorem za současného působení světla a diatomického kyslíku, přičemž fotosenzitizátorem je funkcionální barvivo se schopností produkovat reaktivní formy kyslíku, zejména singletní kyslík, interakcí se světlem a diatomickým kyslíkem.
2. Způsob inaktivace patogenních prionů podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že fotosenzitizátor tvoří alespoň jedna látka ze skupiny derivátů fenothiazinu, porfyrinů, chlorinů, aminolevulové kyseliny, fenazinů, cyaninů, ftalocyaninů, naftalocyaninů.
3. Způsob inaktivace patogenních prionů podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že fotosenzitizátor je tvořen látkou ze skupiny ftalocyaninů, přičemž základní strukturu fotosenzitizátoru tvoří sulfo skupiny nebo karboxy skupiny, nebo sulfamidické skupiny na ftalocyaninovém (porfyrinovém) skeletu.
4. Způsob inaktivace patogenních prionů podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že fotosenzitizátor obsahující sulfo skupiny nebo karboxy skupiny se aplikuje ve formě sodné, draselné, litné nebo amonné soli.
5. Způsob inaktivace patogenních prionů podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že fotosenzitizátor obsahující sulfamidické skupiny se aplikuje ve formě solí kyseliny chlorovodíkové, octové, ascorbové, mléčné, citronové, nebo ve formě směsi těchto solí.
6. Fotosenzitizátor pro inaktivaci patogenních prionů v nebo na organických nebo anorganických substrátech způsobem podle nároku 1 tvořený alespoň jednou látkou ze skupiny derivátů fenothiazinu, porfyrinů, chlorinů, aminolevulové kyseliny, fenazinů, cyaninů, ftalocyaninů, naftalocyaninů.

7. Fotosenzitizátor podle nároku 6 tvořený látkou ze skupiny ftalocyaninů, přičemž základní strukturu molekuly tvoří sulfo skupiny nebo karboxy skupiny nebo sulfamidické skupiny na ftalocyaninovém (porfyrinovém) skeletu.
8. Fotosenzitizátor podle nároku 7, který obsahuje sulfo skupiny nebo karboxy skupiny a je ve formě sodné, draselné, litné nebo amonné soli.
9. Fotosenzitizátor podle nároku 7, který obsahuje sulfamidické skupiny a je ve formě solí kyseliny chlorovodíkové, octové, ascorbové, mléčné, citronové, nebo ve formě směsi těchto solí.
10. Použití fotosenzitizátoru tvořeného alespoň jednou látkou ze skupiny derivátů fenothiazinu, porfyrinů, chlorinů, aminolevulové kyseliny, fenazinů, cyaninů, ftalocyaninů, naftalocyaninů pro inaktivaci patogenních prionů v nebo na organických nebo anorganických substrátech a pro ochranu těchto substrátů před napadením patogenními priony.
11. Použití fotosenzitizátoru tvořeného látkou ze skupiny ftalocyaninů, jehož základní strukturu molekuly tvoří sulfo skupiny nebo karboxy skupiny nebo sulfamidické skupiny na ftalocyaninovém (porfyrinovém) skeletu, pro inaktivaci patogenních prionů v/na organických nebo anorganických substrátech a pro ochranu těchto substrátů před napadením patogenními priony.
12. Použití fotosenzitizátoru obsahujícího sulfo skupiny nebo karboxy skupiny, aplikovaného ve formě sodné, draselné, litné nebo amonné soli pro inaktivaci patogenních prionů v nebo na organických nebo anorganických substrátech a pro ochranu těchto substrátů před napadením patogenními priony.

13. Použití fotosenzitizátoru obsahujícího sulfamidické skupiny a aplikovaného ve formě soli kyseliny chlorovodíkové, octové, ascorbové, mléčné, citronové, nebo ve formě směsi těchto solí pro inaktivaci patogenních prionů v/na organických nebo anorganických substrátech a pro ochranu těchto substrátů před napadením patogenními priony.